

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIO QUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Desarrollo y validación prospectiva del método de
análisis de valoración de Glimipiride 2mg/ Rosiglitazona
4mg Tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de
alta performance**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Felipe Ramírez Huayhuas

Luis Enrique Acosta Castillo

ASESOR

Delia Whu Whu

Lima – Perú

2007

A Dios y a mis padres Felipe y Marina,
con eterna gratitud, por el amor que me dan
día a día, a mis hermanos por su comprensión,
a Kelly por el cariño y amistad brindada y a
la familia García Pasco por apoyo incondicional.

Felipe

A mis padres Alejandro y Julia, que son mi máximo orgullo,
por su cariño y dedicación,
A mis hermanos por su afecto, ayuda y comprensión, a Estela
por su compañía e incondicionalidad , a mis tíos y primos por su preocupación y
todo el apoyo prestado y a Dios, que es fuente de vida y luz que guía e
ilumina todos mis pasos.....

Luis

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora Dra. Delia Whu Whu por las sugerencias impartidas para la realización del presente trabajo.

A Laboratorios Farminindustria S.A en las personas de su gerente de planta, Ing. Lilly Vásquez y su Directora Técnica, Dra. Rosa Guillermo T. por el apoyo y facilidades brindadas.

A nuestras familias, por su apoyo incondicional, permanente aliento que hizo posible la realización de este trabajo.

A nuestros amigos y compañeros de trabajo Dr. Erick Cuadros Quiroz y Dra. Consuelo Rivera por su constante apoyo incondicional.

A nuestra Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la excelente formación profesional recibida.

INDICE GENERAL

RESUMEN	5
SUMMARY	6
I. INTRODUCCION	7
1.1 Objetivo General	8
1.2 Objetivo Especifico	8
1.3 Hipotesis	8
II. GENERALIDADES	9
2.1 Validación	9
2.2 Tipos de validación	9
2.2.1 Validación prospectiva	9
2.2.2 Revalidación o postvalidación	9
2.2.3 Validación retrospectiva	10
2.2.4 Validación analítica	10
2.2.4.1 Flujograma del distema de validación	11
2.2.5 Parámetros de validación	12
2.2.5.1 Exactitud	12
2.2.5.2 Precisión	12
2.2.5.2.1 Repetibilidad	13
2.2.5.2.2 Reproducibilidad	13
2.2.5.3 Especificidad	13
2.2.5.4 Limite de detección	13
2.2.5.5 Limite de cuantificación	14
2.2.5.6 Linealidad e intervalo	14
2.2.6 Datos requeridos para la validación de una determinación	15
2.3 Análisis Instrumental	16
2.3.1 Cromatografía	16
2.3.2 Cromatografía Liquida de Alta Performance	17
2.3.2.1 Aparato cromatográfico	18
2.3.2.2 Sistemas de bombeo	19

2.3.2.3	Inyectores.....	19
2.3.2.4	Columna.....	20
2.3.2.5	Detectores.....	20
2.3.2.6	Termostatos.....	21
2.3.2.7	Sistema de recolección de datos.....	21
2.3.3	Verificación del equipo cromatográfico.....	22
2.3.3.1	Calificación del fabricante.....	22
2.3.3.2	Calificación de la instalación.....	23
2.3.3.3	Calificación de operación.....	23
2.3.3.4	Calificación de la performance.....	24
2.3.3.5	Mantenimiento y recalificación.....	24
2.4	Rosiglitazona.....	25
2.4.1	Propiedades físicas y químicas y farmacológicas.....	25
2.5	Glimepiride.....	26
2.5.1	Propiedades físicas y química y farmacológicas.....	26
III.	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Desarrollo de la validación del método analítico.....	27
IV.	Discusión de resultados.....	92
V.	Conclusiones.....	95
VI.	Recomendaciones.....	96
VII.	Bibliografía.....	97

RESUMEN

El presente trabajo desarrolla la validación prospectiva de una forma farmacéutica sólida cuyos principios activos contenidos son Rosiglitazona y Glimepiride, de tal modo que se demostró y estableció evidencia documentada que el proceso de análisis cumple de manera robusta y repetitiva lo que estaba previsto basado protocolo planificado, llamado protocolo de validación, obtenido de la secuencia de desarrollo del nuevo producto y de la metodología de análisis.

En la parte inicial de este trabajo se procede a recopilar toda la información bibliográfica necesaria para luego proceder con los primeros análisis exploratorios. Inicialmente con la intención de cuantificar ambos principios activos mediante un solo sistema cromatográfico, no obteniendo resultados esperados, seguidamente se procedió a probar sistemas cromatográficos diferentes para cada principio activo obteniendo los resultados adecuados para obtener la metodología analítica correcta. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas finales con los parámetros definidos para el trabajo, se ejecuta el protocolo de validación del método desarrollado para lo cual se cuenta con el diseño experimental y los procedimientos estadísticos, concluyendo que la metodología analítica propuesta es lineal, exacta, y selectiva, cumpliendo así con los parámetros de validación establecidos en las obras oficiales; por lo cual el método validado es confiable y puede ser empleado en los análisis de rutina.

PALABRAS CLAVES

- Rosiglitazona Maleato
- Glimepiride
- Validación
- Cromatografía

SUMMARY

The present work develops the Prospective Validation of a Solid Pharmaceutical Form, which drugs are Rosiglitazone and Glimepiride, in such a way that it was demonstrated and established documented evidence that the process of analysis fulfills in a robust and repetitive way what there was foreseen based planned protocol, so-called Protocol of Validation, obtained of the sequence of development of the new product and of the methodology of analysis.

At the first part of this work, all the bibliographical necessary information is proceeded to compile then to proceed with the first exploratory analyses. Initially with the intention of quantifying both active beginning by means of only one system cromatographic, not obtaining awaited results, then it was proceeded to prove in different system cromatographics by the every active beginning obtaining the results adapted to obtain the analytical correct methodology.

As soon as the last conditions cromatographic were established with the parameters defined for the work, there is executed the Protocol of Validation the method developed for which is counted by the experimental design and the statistical procedures, concluding that the analytical proposed methodology is linear, exact, and selective, expiring this way with the parameters of ratification established in the official works; for which the validated method is reliable and can be used in the analyses of routine.

Key Words

- Rosiglitazone Maleate
- Glimepiride
- Validation
- Chromatography

I. INTRODUCCION

La industria farmacéutica se ha caracterizado desde sus inicios; por la necesidad de alcanzar altos niveles de calidad, para lo cual fue desarrollando procedimientos que han evolucionado con una reglamentación estricta; en este avance por conseguir un alto dominio de la calidad, es cuando surge el concepto de validación.

La Validación de un método analítico nos asegura que la metodología es exacta, reproducible y resistente sobre el rango específico donde un analito es analizado. La validación de un método nos garantiza su funcionabilidad y por lo tanto cumple con normas y reglamentaciones establecidas. Para obtener resultados mas exactos deben considerarse todas las variables del método que incluyen preparación de muestras, separación cromatográfica, detección y evaluación de datos, utilizando la misma matriz que la muestra en cuestión y siguiendo parámetros establecidos por farmacopeas vigentes.

La Validación es parte integral de las buenas practicas de manufactura y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además contribuye a garantizar la calidad de un producto determinado.

El hecho de contar con los procesos validados no solo significa para la industria farmacéutica tener producto de calidad que le permitan garantizar su efectividad para entrar y mantenerse en el exigente mercado farmacéutico, si no que también significa un valioso ahorro en tiempo y dinero, ya que se minimizan los riesgos de perder lotes de producción por errores generados durante el transcurso de la fabricación, así como también minimizar al máximo los posibles errores generados al momento de cuantificar el principio activo en la forma farmacéutica que lo contiene.

Nuestros objetivos en el presente trabajo son:

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) aplicado a rosiglitazona más glimepiride en su forma farmacéutica tabletas para realizar los respectivos análisis químicos de cuantificación.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Demostrar que el método analítico de cuantificación de rosiglitazona más glimepiride por HPLC reúna las características y atributos de calidad exigidos por la USP y cumpla con las especificaciones establecidas en los análisis de los diferentes lotes que se fabriquen.
- Reconocer la importancia de la validación como una herramienta de mejoramiento continuo de la calidad en la industria farmacéutica.

1.3 HIPOTESIS

- Para el análisis de todo principio activo se busca desarrollar un método sensitivo y selectivo que proporcione una alta confiabilidad de los resultados a obtener; siendo el HPLC el más empleado por la separación del principio activo de la matriz en la que se encuentre.
- La validación de un método nuevo es un requisito imprescindible para el cumplimiento de las Buenas Practicas de Laboratorio establecido por agencias regulatorias (DIGEMID) y las diversas Farmacopeas

II GENERALIDADES

2.1 VALIDACIÓN

Definimos validación como un programa documentado que asegura que un proceso determinado proporciona de forma homogénea y reproducible un producto que cumple con las especificaciones previamente establecidas.

Es la comprobación formal y sistemática de que un proceso de fabricación y análisis de un producto, al mantener los métodos de producción y control establecidos, satisface los requisitos de calidad. (1)(2)(3)(4)(7)(8)

2.2 TIPOS DE VALIDACIÓN

2.2.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA

Es el establecimiento documentado de la evidencia de que un sistema hace lo que debe hacer basándose en un protocolo planificado, se realiza en productos nuevos y se lleva a cabo antes de la comercialización del producto.

En la validación prospectiva de análisis, un plan experimental llamado *Protocolo de Validación* es ejecutado el cual es determinado en base a la información de apoyo recopilada de los resultados de ensayos experimentales previos.(3)(4)(5)(6)(8)(9)

2.2.2 REVALIDACIÓN

Una revalidación se da cuando la introducción de un cambio puede afectar a la idoneidad del proceso establecido por la validación, la cual puede ser parcial o total de dicho proceso.

Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos:

- Cambios importantes en los parámetros del proceso (composición, tamaño del lote, etc)
- Cambios importantes en los materiales de partidas (granulometría, densidad, etc.)

- Cambios importantes en el sistema cromatográfico (fase móvil, columna, diluyente).
- Cambios en las especificaciones (5)(6)(8)(9)(22)

2.2.3 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA

Estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que establece previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica, proporcionada por los registros de producción y de control de calidad. (4)(5)(6)(8)

2.2.4 VALIDACIÓN ANALÍTICA

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

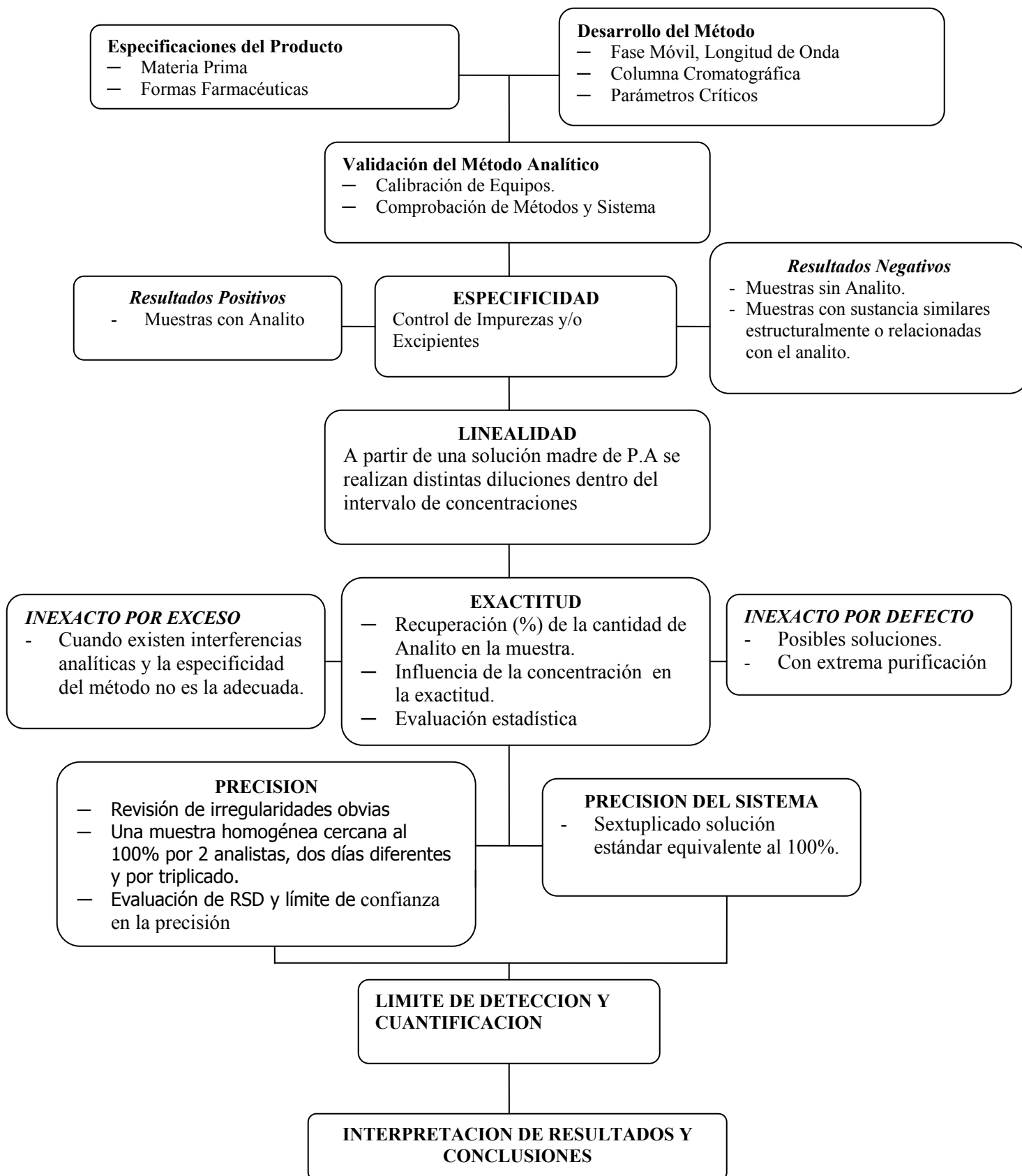
La validación es así mismo una parte integral del desarrollo de un método de análisis, puesto que sin fiabilidad en los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas y que por lo tanto su calidad es la adecuada. (1)(2)(7)(8)(10)(13)

Los parámetros que deben ser considerados en una validación analítica son:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Limite de detección
- Limite de cuantificación
- Linealidad e intervalo

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de estos parámetros analíticos. (1)(2)(11)(12)

2.2.4.1 FLUJOGRAMA DE SISTEMA DE VALIDACION



2.2.5 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

2.2.5.1 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.

La exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (estándar de referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido

En la valoración de un fármaco de un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo de método.

En el análisis cuantitativo de impurezas la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza. (1)(2)(3)(10)(12)(22)

2.2.5.2 PRECISION

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. (1)(2)(4)(22)

2.2.5.2.1 Repetibilidad

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por el mismo analista bajo condiciones iguales en relación a: reactivos, equipos y cortos intervalos de tiempo. La repetibilidad mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. (1)(2)(3)

2.2.5.2.2 Reproducibilidad

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, tales como distintos laboratorios, reactivos de distintas marcas, equipos de trabajo diferentes, etc

Se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones validas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa. (1)(2)(3)

2.2.5.3 ESPECIFICIDAD

Se define como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz, la falta de especificidad de un procedimiento analítico.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica se realiza agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños. (1)(2)(3)

2.2.5.4 LIMITE DE DETECCIÓN

Es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de

un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra. (1)(2)(3)(21)

2.2.5.5 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra. (1)(2)(3)

2.2.5.6 LINEALIDAD E INTERVALO

Definición de linealidad.- La linealidad de un método es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. (5)(6)

Definición de intervalo.- el intervalo de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método que se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el método analítico. El intervalo del método se valida verificando que el método analítico proporciona analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

Para establecer la linealidad se utiliza normalmente un mínimo de cinco concentraciones. Se deben considerar también los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

- Valoración de un fármaco (o de un producto terminado): de 80 a 120% de la concentración de prueba.
- Determinación de una impureza: de 50 a 120% de la especificación. (1)(2)(3)

2.2.6 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACION DE UNA DETERMINACION

Los procedimientos para las determinaciones farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos.

Categoría I

Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingrediente activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II

Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados

Categoría III

Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (disolución, liberación del fármaco)

Categoría IV

Métodos analíticos diseñados para establecer identidad.

La validez de un método analítico puede verificarse solo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la finalización con éxito de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un método es adecuado para sus aplicaciones previstas. (1)(2)(3)

Característica de Desempeño Analítico	Categoría I de Valoración	Categoría II de Valoración		Categoría III de Valoración	Categoría IV de Valoración
		Prueba de Limite Cuantitativa	Prueba de Limite Cuantitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Limite de Detección	No	No	Si	*	No
Limite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

2.3 ANALISIS INSTRUMENTAL

2.3.1 CROMATOGRAFIA

La cromatografía se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o mas fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en las que sustancias individuales presentan diferente movilidades a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos. (1)(2)(13)

La técnica cromatográfica general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil) la fase móvil transfiere el soluto a través del medio hasta que este finalmente emerge separado de otros solutos que eluyen antes o después. En general, el soluto es transportado a través del medio de separación por medio de una corriente disolvente líquido o gaseoso denominado “eluyente”. La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, como en el caso de adsorbentes como la alumina activada y el gel de sílice, o puede actuar por disolución del soluto, produciendo una partición del soluto entre la fase móvil estacionaria y la móvil. (1)(2)(13)(14)

Los tipos de cromatografía útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo que se emplean en los procedimientos cromatográfica de la USP son: cromatografía en columna, de gases, en papel, en capa delgada (incluida la cromatografía en capa delgada de alta resolución) y de líquidos presurizados (comúnmente llamada cromatografía líquida de alta performance). La cromatografía en papel y en capa delgada son por lo general más útiles para fines de identificación, debido a su comodidad y sencillez. La cromatografía en columna ofrece una mayor variedad de fases estacionaria y es útil para la separación cuantitativa de compuestos individuales contenidos en una mezcla. Las modernas técnicas de cromatografía en capa delgada de alta resolución, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos presurizados requieren aparatos más complejos pero proporcionan generalmente métodos de alta resolución e identifican cantidades muy pequeñas de material. (1)(2)(13)

2.3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta performance, a veces llamada cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y fase móvil líquida. La separaciones se logran por procesos de partición, absorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. La HPLC tiene ventajas características sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos que se va a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto la mayoría de los fármacos aun siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden cromatografiarse sin descomposición o sin necesidad de hacer derivados volátiles. La mayoría de los análisis farmacéuticos se basan en la cromatografía de partición y completan dentro de los 30 minutos. (1)(2)(13)

Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

Es la técnica más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal al desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostatos para las columnas
- F) Detectores
- G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador

2.3.2.1 APARATO CROMATOGRAFICO

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos, por ejemplo una computadora, un integrador o un registrador. Las columnas cortas de diámetro interior pequeño que contienen un relleno denso de partículas de fase estacionaria permiten un intercambio rápido de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Además de recibir y reproducir las señales enviadas por el detector, las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos y permiten periodos largos de operación sin necesidad de supervisión. (1)(2)(13)

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable.

2.3.2.2 SISTEMAS DE BOMBEO

Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones.

Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

- **Bombas recíprocas o de vaivén.** - El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante
- **Bombas neumáticas o de presión constante,** hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.
- **Bombas de desplazamiento o tipo jeringa,** consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml. (1)(2)(13)

2.3.2.3 INYECTORES

Después de ser disueltos en la fase móvil o otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil ya sea manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones y los ciclos de enjuague de espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas.

Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:

- El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi.
- Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado. (1)(2)(13)

2.3.2.4 COLUMNA

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos en fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3µm a 10µm de diámetro pero los tamaños pueden llegar a 50µm para las columnas preparativas. Las partículas pequeñas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa y por lo tanto se obtiene una transferencia rápida de los compuestos entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos que varía desde el octadecilsilano relativamente no polar a grupos nitrilos muy polares. (14)

El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible. (1)(2)(13)

2.3.2.5 DETECTOR

El detector nos indica los momentos de aparición de los componentes, y proporcionan indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de

características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura.

En análisis de rutina por HPLC los más usados son los detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.

El detector debe tener un rango dinámico lineal amplio y los compuestos que se miden deben resolverse de cualquier sustancia que interfiera. El intervalo dinámico lineal de un compuesto es el intervalo en el que la respuesta de la señal del detector es directamente proporcional a la cantidad del compuesto. Los sistemas de HPLC se calibran graficando las respuestas de los picos en funciones de concentraciones conocidas de un estándar de referencia, empleando un procedimiento de estandarización externa o interna. (1)(2)(13)

2.3.2.6 TERMOSTATOS

El cromatógrafo incluye una cámara de volumen suficiente y fácil acceso para instalar la columna, que puede ser termostatizada. En la mayoría de aplicaciones no se necesita un control estricto de temperatura y las columnas trabajan a temperatura ambiente. sin embargo en algunas ocasiones se debe trabajar a temperaturas mayores a las de ambiente. La mayoría de los instrumentos llevan actualmente hornos para columnas que controlan y mantienen constante la temperatura de la columna. (1)(2)(13)

2.3.2.7 SISTEMA DE RECOLECCION DE DATOS

Actualmente los equipos disponibles en el mercado constan de un registrador grafico que convierte la señal X –Y, un integrador que permite obtener un registro

grafico y una calibración adecuada, una computadora que nos permite calcular apropiadamente, almacenar los ensayos, y la generación de reportes.

2.3.3 VERIFICACION DEL EQUIPO CROMATOGRAFICO

Además de todo el trabajo de validación que se debe realizar para cada producto ensayado en el sistema de valoración por HPLC, se necesita establecer y documentar correctamente una “cadena de cumplimiento” para todos los instrumentos (primarios y secundarios y terciarios) usados para sustentar los datos de GMP que genera el sistema.

Se hace necesario calificar y calibrar todos los componentes de dicho sistema, por ejemplo el equipo HPLC y todos los equipos auxiliares.

La calibración tiene por finalidad verificar que el instrumento cumpla las especificaciones de la USP y eliminar los efectos de variables controlables atribuibles al aparato en sí y/o técnica experimental del analista. Se aplica al ciclo completo de vida de un instrumento, empezando por su desarrollo y fabricación, continuando con su uso y mantenimiento para finalizar con su obsolescencia. La calificación se aplica a la etapa del proceso de calibración.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

Etapas 1 : Calificación del fabricante (D.Q.)

Etapas 2 : Calificación de la instalación (I.Q.)

Etapas 3 : Calificación de operación (O.Q.)

Etapas 4 : Calificación de la performance (P.Q.)

Etapas 5 : Mantenimiento y recalificación

2.3.3.1 Calificación del Fabricante (D.Q.)

Es la evidencia documentada de que en el diseño se incluyeron factores que servirán de soporte para las etapas posteriores a la validación, es la evidencia de que la calidad es tenida en cuenta y construida desde su diseño. Es una fase eminentemente organizativa, se definen los requerimientos, las especificaciones y

las descripciones del equipo cromatográfico, es una fase previa a la compra e instalación.

El laboratorio es la responsable por el cumplimiento de las GMP cuando se usa instrumentación automatizada, y puede escoger el criterio de aceptación de la calificación establecido por la USP, el definido por el vendedor del instrumento o utilizar sus procedimientos de operación estándares (POS).

2.3.3.2 Calificación de la Instalación (I.Q.)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación están de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y de conformidad con las normas reglamentarias.

La finalidad de la calificación de la instalación de un sistema, maquinaria o equipo, es asegurar que ha quedado instalado de acuerdo al diseño y especificaciones del mismo, y que por lo tanto, se puede esperar razonablemente que el proceso involucrado se comporte de acuerdo a lo esperado.

Durante la instalación, los números de serie son grabados, y todo lo concerniente a fluido, electricidad y conexiones son documentados y describe:

- Nombre del equipo
- Nombre del fabricante
- Modelo
- Numero de serie
- Fecha y condiciones en la que fue recibido
- Fecha de funcionamiento en el laboratorio
- Localización del equipo en el laboratorio
- Procedimiento operacional
- Instructivo de mantenimiento

2.3.3.3 Calificación de Operación (O.Q.)

Es la verificación de que los equipos funcionan en la forma esperada y son capaces de operar satisfactoriamente sobre todo en el rango de los parámetros

operacionales para los que han sido diseñados. La finalidad es demostrar que el sistema, maquinaria y/o equipo involucrado opera correctamente una vez que se ha concluido la calificación de la instalación.

Después de que la calificación de la instalación y de que la calibración se hayan completado, es necesario evaluar el correcto funcionamiento del sistema HPLC :

Bomba : reproducibilidad de flujo, precisión de gradiente.

Inyector : reproducibilidad, residuo de muestra.

Horno : reproducibilidad de temperatura.

Detector : Ruido, energía de lámpara, relación señal/ruido.

2.3.3.4 Calificación de la Performance (P.Q.)

Es el programa documentado que busca demostrar la efectividad y reproducibilidad del equipo bajo condiciones normales de operación.

La finalización de forma satisfactoria de la calificación del funcionamiento permitirá terminar los procedimientos de calibración, fabricación y limpieza. Así, permitirá la aprobación formal de las instalaciones, sistemas y equipos.

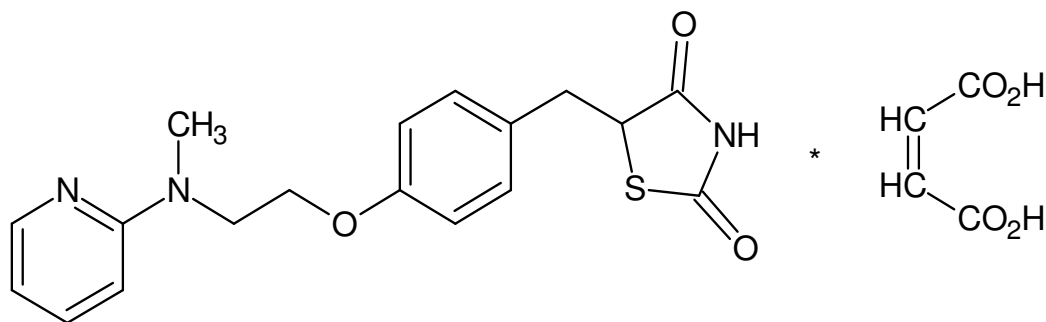
2.3.3.5 Mantenimiento y Recalificación

El mantenimiento se realiza después de un determinado tiempo de uso y debe procederse de acuerdo al procedimiento de mantenimiento especificado en el protocolo, seguido de una nueva calificación del sistema. El periodo determinado de uso se define como un intervalo de tiempo razonable durante el cual el equipo funciona sin pérdida de especificación. (8)(11)(13)(15)(18)(19)(22)

2.4 ROSIGLITAZONA MALEATO

2.4.1 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS

- ♦ Descripción: Es un agente antidiabético oral, de la clase de las tiazolidinadionas (troglitazona), que no está relacionada química ni farmacológicamente con las sulfonilureas, bioguanidas o inhibidores de la alfa-glucosidasa. Actúan principalmente incrementando la sensibilidad de la insulina.
- ♦ Químicamente la Rosiglitazona maleato es (±)-5-[[[4-[2-(metil1-2-piridinilamino)etoxi]fenil]metil]-2,4-tiazolidinediona,(Z)-2-butanodioato(1:1) con peso molecular de 473,52 como sal y como base libre 357,44. La Rosiglitazona maleato tiene un centro quiral y se presenta como racemato.
- ♦ Aspecto: Polvo de color blanco a blanco crema.
- ♦ Fórmula molecular: $C_{18}H_{19}N_3O_3S \cdot C_4H_4O_4$.
- ♦ Punto de fusión: 122°C.
- ♦ Solubilidad: Muy soluble en etanol y en soluciones buffers con un pH de 2,3; su solubilidad decrece cuando se incrementa el pH de las soluciones. (14)

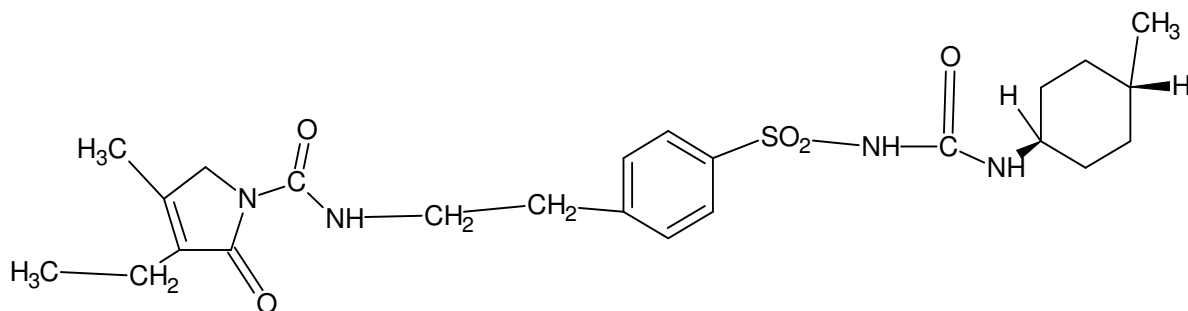


ROSIGLITAZONA MALEATO

2.5 GLIMEPIRIDE

2.5.1 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS

- ♦ Descripción: Es un agente antidiabético oral derivado de la clase de las sulfonilureas que promueve el aumento de la secreción de insulina por parte de las células beta de los islotes del páncreas. Químicamente el Glimepiride es 1-[[p-[2-(3-etil-4-metil-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido)etil]fenil]sulfonil]-3-(trans-4-metilciclohexil)urea, con un peso molecular de 490,62.
- ♦ Aspecto: Polvo blanco a ligeramente amarillento, prácticamente inodoro
- ♦ Fórmula molecular: $C_{24}H_{34}N_4O_5S$.
- ♦ Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua. (14)(16)(17)



GLIMEPIRIDE

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	1
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DESARROLLO DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 2
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Contenido:

1. Objetivo
2. Alcance
3. Justificación
4. Calificación del Instrumental
5. Método Analítico
 - 5.1 Desarrollo de la técnica analítica
 - 5.2 Materiales, reactivos y equipos
 - 5.3 Condiciones de trabajo
 - 5.4 Procedimiento analítico para validación de glimepiride
 - 5.5 Procedimiento analítico para validación de rosiglitazona
6. Parámetros de Validación
 - 6.1 Desarrollo de los parámetros de validación de glimepiride
 - 6.2 Desarrollo de los parámetros de validación de rosiglitazona
 - 6.3 Tratamiento estadístico
7. Informe técnico
 - 7.1 Resumen de resultados : glimepiride
 - 7.2 Resumen de resultados : rosiglitazona

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 3
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

1. Objetivo

Demostrar que el método de valoración cuantitativo de rosiglitazona y glimepiride tabletas recubiertas, cumple con los parámetros de especificidad, precisión y linealidad, en un intervalo de tiempo establecido y a lo largo de la prueba. De esta manera se establece que el método esta totalmente bajo control y proporciona de forma constante y repetitiva resultados que cumplen con las especificaciones establecidas.

2. Alcance

Este protocolo describe al método cuantitativo de rosiglitazona y glimepiride tabletas recubiertas por Cromatografía Líquida de Alta Presión.

3. Justificación

Dado que el método cuantitativo de rosiglitazona y glimepiride por HPLC no esta considerado en obra oficial alguna (USP, BP), se hace necesario su validación para demostrar su fiabilidad.

4. Calificación del Instrumento

Equipo : Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC)

Marca : Hewlett Packard

Modelo : Serie 1100

Equipado con los siguientes módulos:

Horno de Columnas : Modelo HP G1316A Serie DE5300566

Desgasificador : Modelo HP G1316A Serie DE5300566

Bomba Cuaternaria : Modelo HP G1316A Serie DE5300566

Detector UV : Modelo HP G1316A Serie DE5300566

Inyector Automático : Modelo HP G1316A Serie DE5300566

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 4
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Estación compatible de trabajo marca HACER

Calibración y/o verificación : Conforme

Equipo : Balanza analítica

Marca : Mettler Toledo

Modelo : AB204

Calibración o verificación diaria : Conforme

Equipo : Ultrasonido BRANSONIC

Marca : Branson

Modelo : 3510

Calibración o verificación reciente : No Aplica

Equipo : Potenciometro Perkin Elmer

Marca : Orion

Calibración o verificación diaria : Conforme

5.- Método analítico

El método analítico descrito se desarrollo y valido por Cromatografía Liquida de Alta Performance.

5.1 Desarrollo de la técnica analítica

El desarrollo de los métodos de cromatografía liquida se ha basado durante muchos años en laboriosos ensayos de disolvente en disolvente en diferentes columnas, para el desarrollo de esta técnica de análisis se procedió a probar diferentes sistemas cromatográficos con la finalidad de encontrar un solo sistema que permita la identificación y cuantificación de ambos principios activos. Se

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 5
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

obtuvieron resultados poco satisfactorios debido a las propiedades fisicoquímicas muy diferentes para cada principio activo. Debido a este inconveniente se debió elegir una fase móvil para cada principio activo en la cual se disuelvan fácilmente si se realiza la detección en el UV lejano, la fase móvil debe tener una baja absortividad molar en el UV en la zona de detección.

Esta evaluación de las solubilidades es esencial para evitar una fase móvil que pueda precipitar en el instrumento toda la muestra o parte de ella. Los disolventes cromatográficos utilizados a prueba fueron: hexano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, metanol y agua.

Seguidamente a la selección de la fase móvil se procedió a evaluar algunas consideraciones del detector como el intervalo espectral de transparencia del disolvente y la longitud de onda de máxima absorción de cada principio activo.

Una vez hallada la fase móvil correcta se procedió a probar la columna cromatográfica que diera una mejor performance. Para rosiglitazona se probó una ODS de 75mm x 4,6mm dando los resultados esperados, para glimepiride se probó una columna especial ODS 125mm x 4,0mm con grupos ácidos sulfónicos debido al carácter ácido de la fase móvil.

5.2 Materiales

- Vasos de 2 litros de plástico.
- Fiolas de 50 mL.
- Fiolas de 500 mL.
- Fiolas de 100 mL.
- Fiolas de 200 mL.
- Pipetas de 2 mL.
- Pipetas de 5 mL.
- Pipetas de 7 mL.
- Pipetas de 25 mL.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 6
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

- Beaker de 25 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Membranas filtrantes de 0,45um de poro.
- Portafiltros y jeringas descartables.
- Viales de HPLC de 2 mL y tapas para los mismos.
- Columna cromatográfica : Prontosil 120-5-C18-SH (5um), 125 mm x 4 mm, Bischoff.
Lichrospher RP-18 (5um), 75 mm x 4,6 mm Merck.

Reactivos :

- Metanol HPLC
- Acetonitrilo HPLC
- Fosfato de sodio dibásico dihidratado grado reactivo.
- Sodio lauril sulfato grado reactivo.
- Ácido fosfórico grado reactivo.
- Sodio fosfato monobásico grado reactivo.
- Ácido clorhídrico grado reactivo.

Equipos

- Cromatógrafo Liquido de Alta Presión
- Balanza Analítica
- Ultrasonido
- Potenciómetro

5.3 Condiciones de trabajo

Se realizó en condiciones normales de trabajo a temperatura ambiente.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 7
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Estándares de referencia

Nombre : Glimepiride

Protocolo : 5112072

Pot t/c : 99,81 %

Vencimiento : 11/07

Nombre : Rosiglitazona

Protocolo : 5105944

Pot t/c : 96,17%

Vencimiento : 05/07

Muestra

Aspecto : Tableta circular, biconvexa, con ranura central en una cara de color blanco con recubierta de color rosado

Peso Promedio : 206 mg/tab

Principios Activos : rosiglitazona y glimepiride

Rosiglitazona y Glimepiride : 2mg/ 4mg (90% - 110%)

Excipientes : c.s.p

Método Propuesto : Cromatografía Líquida de Alta Performance.

5.4 Procedimiento analítico para validación de rosiglitazona.

Se procedió de la siguiente manera:

Método : Cromatografía Líquida de Alta Performance

Sistema cromatográfico

Columna : Lichrospher RP-18 (5um), 75mm x 4,6mm Merck

Flujo : 1,2 mL/min

Longitud de onda : 320 nm

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 8
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Volumen de inyección : 10uL

Temperatura : 30°C

Tiempo de corte aprox. : 6 min

Fase móvil

Acetonitrilo : Buffer (34:66)

Ajustar el pH a $7,1 \pm 0,1$ con ácido fosfórico

Medir en probetas separadas los volúmenes indicados y mezclar en un recipiente adecuado. Filtrar por filtro de membrana nylon de 0,45 um.

Buffer : Pesar 1,77g de fosfato de sodio dibásico dihidratado y 1,44g de sodio lauril sulfato, adicionar 1000mL de agua y homogeneizar.

Preparación de las soluciones de trabajo :

Solución estándar de referencia

Concentración final: rosiglitazona 24ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar.

Solución muestra

Concentración final: rosiglitazona 24ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 3 tabletas recubiertas (equivalente a 12mg de rosiglitazona), agregar 400mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 9
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO : VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
	Nº	FECHA
	01	SEP/07

minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 min.

Filtrar las soluciones de trabajo por membrana de nylon de 0,45um de poro.

Adecuación del sistema

Se inyectó el volumen indicado de solución de referencia mínimo por quintuplicado. Con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema : bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos.

PARAMETRO	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO
Repetibilidad		
Tiempo de retención	RSD < 1,0%	0,0964
Áreas	RSD < 2,0%	1,3463
Factor de capacidad	Mayor de 2,0	2,3
Factor de cola	Máximo 2,0	1,25
Platos teóricos	Mínimo 2000	2850

Cálculo

Rosiglitazona mg/tab rec : $\frac{Amp}{A_{st}} \times \frac{P_{st}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{P_{mp}} \times P_x \times \frac{Pot_{st}}{100} \times \frac{357,43}{473,51}$

Donde

Amp : Área de rosiglitazona maleato en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de rosiglitazona maleato en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de rosiglitazona en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 10
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de rosiglitazona maleato/mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

357,43/473, 51 : Conversión de rosiglitazona maleato a rosiglitazona.

5.5 Procedimiento analítico para validación de glimepiride.

Método : Cromatografía Líquida de Alta Performance

Sistema cromatográfico

Columna : ProntoSil 120-5-C18-SH (5µm), 125 mm x 4 mm, Bischoff.

Flujo : 1,5 mL/min

Longitud de onda : 228 nm

Volumen de inyección : 10µL

Temperatura : 30°C

Tiempo de corte aprox. : 5 min

Fase Móvil :

Acetonitrilo : 550mL

Agua : 450mL

Sodio Fosfato Monobásico : 0,5 gramos

Una vez disuelta la sal ajustar el pH a $3,0 \pm 0,1$ con ácido fosfórico

Filtrar por filtro de membrana nylon de 0,45 µm, trasvasar en un frasco apropiado y llevar a ultrasonido por 5 minutos.

Solución estándar de referencia

Concentración final: glimepiride 20µg/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 11
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar.

Solución muestra

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 206mg de polvo fino (equivalente a 2mg de glimepiride), agregar 150mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar.

Filtrar las soluciones de trabajo por membrana de nylon de 0,45um de poro.

Adecuación del sistema

Se inyectó el volumen indicado de solución de referencia mínimo por quintuplicado. Con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema : bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos.

PARAMETRO	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO
Repetibilidad		
Tiempo de retención	RSD < 1,0%	0,1129
Áreas	RSD < 2,0%	0,4620
Factor de capacidad	Mayor de 2,0	2,4
Factor de cola	Máximo 2,0	1,65
Platos teóricos	Mínimo 2000	2560

Cálculo

Glimepiride mg/tab rec : $\frac{Amp}{Ast} \times \frac{Pst}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{100}{Pmp} \times Px \times \frac{Pot_{st}}{100}$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	12
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

Donde

Amp : Área de glimepiride en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de glimepiride en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de glimepiride en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de glimepiride /mg
de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 13
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

6. PARAMETROS DE VALIDACION

Desarrollo de los parámetros de validación de glimepiride

- EXACTITUD

Procedimiento analítico

Se preparan tres muestras con el 80%, 100% y 120% de la concentración estimada de glimepiride y se analiza cada solución por triplicado, así se obtiene la desviación estándar relativa (RSD) de cada concentración.

Solución estándar

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 80%

Concentración final: glimepiride 16µg/mL

En un matraz aforado de 25 mL pesar con exactitud 20 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 15 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. (Solución 1)

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 200mg de excipientes y 4mg de rosiglitazona estándar de referencia, adicionar 2 mL de la solución 1 y 60 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro descartando los primeros mililitros del filtrado

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 14
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Solución muestra al 100%

Concentración final: glimepiride 20µg/mL

En un matraz aforado de 25 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 15 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. (Solución 1)

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 200 mg de excipientes y 4 mg de rosiglitazona estándar de referencia, adicionar 2 mL de la solución 1 y 60 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro descartando los primeros mililitros del filtrado

Solución muestra al 120%

Concentración final: glimepiride 24µg/mL

En un matraz aforado de 25 mL pesar con exactitud 30 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 15 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. (Solución 1)

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 200 mg de excipientes y 4 mg de rosiglitazona estándar de referencia, adicionar 2 mL de la solución 1 y 60 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro descartando los primeros mililitros del filtrado.

Cálculos

Mediante la siguiente formula determinaremos la cantidad de analito hallada en cada una de las muestras:

$$\text{mg de glimepiride} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{25}{\text{Pmp}} \times \frac{100}{2} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px}$$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 15
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{25}{2} \times \frac{100}{2} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times 100$$

Amp : Área de glimepiride en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de glimepiride en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de glimepiride en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de glimepiride /mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

- PRECISION

Procedimiento analítico

➤ REPETIBILIDAD

Solución estándar de referencia

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar.

Solución muestra al 80 %

Concentración final: glimepiride 16ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 164,8 mg de polvo fino (equivalente a 1,6 mg de Glimepiride), agregar 50 mL de

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 16
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar.

Solución muestra al 100 %

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 206 mg de polvo fino (equivalente a 2mg de glimepiride), agregar 50 mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar.

Solución muestra al 120 %

Concentración final: glimepiride 24ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 247,2 mg de polvo fino (equivalente a 2,4 mg de glimepiride), agregar 50 mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar.

Filtrar las soluciones de trabajo por membrana de nylon de 0,45um de poro.

Cálculos

$$\text{mg de glimepiride} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{100}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px}$$

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{100}{4} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times 100$$

Amp : Área de glimepiride en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de glimepiride en la solución estándar.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 17
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Pst : Peso del estándar de referencia de glimepiride en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de glimepiride /mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

➤ **PRESICION INTERMEDIA**

En este caso trabajan dos analistas en diferentes días.

Solución estándar de referencia

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar.

Solución muestra al 80 %

Concentración final : glimepiride 16ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 164,8 mg de polvo fino (equivalente a 1,6 mg de glimepiride), agregar 50 mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución muestra al 100 %

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 206 mg de polvo fino (equivalente a 2 mg de Glimepiride), agregar 50mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 18
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Solución muestra al 120 %

Concentración final: glimepiride 24ug/mL

Moler finamente 10 tabletas. En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 247,2 mg de polvo fino (equivalente a 2,4 mg de Glimepiride), agregar 50mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Cálculos

$$\text{mg de glimepiride} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{100}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px}$$

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{100}{4} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times 100$$

Amp : Área de glimepiride en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de glimepiride en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de glimepiride en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de glimepiride /mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 19
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO : VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
	Nº	FECHA
	01	SEP/07

- LINEALIDAD DEL METODO

Se procede a realizar el parámetro de linealidad de estándar de glimepiride utilizando 5 concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, por triplicado, tomando como referencia de 100% del dosaje de glimepiride con el que cuenta la tableta en estudio es decir 2mg/tab.

La concentración final de 100% de glimepiride es de 20µg/mL.

Preparación de las soluciones

Solución estándar 50%

Concentración final: glimepiride 10ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 2 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución estándar 75%

Concentración final: glimepiride 15ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 3 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución estándar 100%

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	20
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución estándar 125%

Concentración final: glimepiride 25ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución estándar 150%

Concentración final: glimepiride 30ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 3 mL y transferir a un matraz aforado de 25 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

- ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Mediante este parámetro se determina la capacidad del método analítico de medir el contenido de Glimepiride sin interferencias de parte de los excipientes presentes o de posibles productos de degradación del principio activo.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	21
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

Procedimiento analítico

Placebo

Pesar exactamente 204 mg de placebo (excipientes), y transferir a un matraz aforado de 100 mL, agregar 50 mL de metanol y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Solución estándar

Concentración final: glimepiride 20ug/mL

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

Determinación de productos de degradación de glimepiride

Se somete al principio activo, a degradación forzada.

TERMOLISIS

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25 mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, llevar a baño maría a una temperatura controlada de 60°C por 2 horas, dejar enfriar, llevar a volumen con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 22
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

FOTOLISIS

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 25mg de glimepiride estándar de referencia, adicionar 50 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 5 minutos, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, someter a la acción de la luz UV (254nm) durante 2 horas, llevar a volumen con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

6.2 Desarrollo de los parámetros de validación de rosiglitazona

- EXACTITUD

Procedimiento analítico

Se preparan tres muestras con el 80%, 100% y 120% de la concentración estimada de rosiglitazona y se analiza cada solución por triplicado, así se obtiene la desviación estándar relativa (RSD) de cada concentración.

Solución estándar

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 80%

Concentración final: rosiglitazona 19,2ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL pesar con exactitud 12,7 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 9,6 mg de rosiglitazona), 600 mg de

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 23
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

excipientes, 2 mg de glimepiride, adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 100%

Concentración final: rosiglitazona 24ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL pesar con exactitud 15,9 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 12 mg de rosiglitazona), 600 mg de excipientes, 2 mg de glimepiride, adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 120%

Concentración final: rosiglitazona 28,8ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL pesar con exactitud 19,1 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 14,4 mg de rosiglitazona), 600 mg de excipientes, 2 mg de glimepiride, adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Cálculos

$$\text{mg de rosiglitazona} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{P_{st}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{P_{mp}} \times \frac{Pot_{st}}{100} \times P_x \times \frac{357,43}{473,51}$$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 24
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px} \times \frac{357,43}{473,51}$$

Donde:

Amp : Área de rosiglitazona maleato en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de rosiglitazona maleato en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de rosiglitazona maleato en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de rosiglitazona maleato/ mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

357,43/ 473,51 : Conversión de rosiglitazona maleato a rosiglitazona

- PRECISION

Procedimiento analítico

➤ **REPETIBILIDAD**

Solución estándar

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 25
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Solución muestra al 80 %

Concentración final: rosiglitazona 19,2 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 2 tabletas recubiertas (equivalente a 8 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 100 %

Concentración final: rosiglitazona 24 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 3 tabletas recubiertas (equivalente a 12 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 120 %

Concentración final: rosiglitazona 28,8 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 4 tabletas recubiertas (equivalente a 16 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Cálculos

Mediante la siguiente formula determinaremos la cantidad de analito hallada en cada una de las muestras:

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 26
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

$$\text{mg de rosiglitazona} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px} \times \frac{357,43}{473,51}$$

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px} \times \frac{357,43}{473,51}$$

Donde:

Amp : Área de rosiglitazona maleato en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de rosiglitazona maleato en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de rosiglitazona maleato en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de rosiglitazona maleato/ mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

357,43/ 473,51 : Conversión de rosiglitazona maleato a rosiglitazona

➤ **PRESICION INTERMEDIA**

En este caso trabajan dos analistas en diferentes días.

Solución estándar

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 27
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Solución muestra al 80 %

Concentración final: rosiglitazona 19,2 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 2 tabletas recubiertas (equivalente a 8 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 100 %

Concentración final: rosiglitazona 24 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 3 tabletas recubiertas (equivalente a 12 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución muestra al 120 %

Concentración final: rosiglitazona 28,8 ug/mL

En un matraz aforado de 500 mL, pesar exactamente 4 tabletas recubiertas (equivalente a 16 mg de rosiglitazona), adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Cálculos

Mediante la siguiente formula determinaremos la cantidad de analito hallada en cada una de las muestras:

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 28
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO : VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
	Nº	FECHA
	01	SEP/07

$$\text{mg de rosiglitazona} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px} \times \frac{357,43}{473,51}$$

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times \frac{\text{Pst}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{500}{\text{Pmp}} \times \frac{\text{Pot st}}{100} \times \text{Px} \times \frac{357,43}{473,51}$$

Amp : Área de rosiglitazona maleato en la solución muestra.

Ast : Promedio de áreas de rosiglitazona maleato en la solución estándar.

Pst : Peso del estándar de referencia de rosiglitazona maleato en mg.

Pmp : Peso de la muestra en mg.

Pot st : Potencia del estándar de referencia expresado en mg de rosiglitazona maleato/ mg de droga tal cual.

Px : Peso promedio de 10 tabletas recubiertas.

357,43/ 473,51 : Conversión de rosiglitazona maleato a rosiglitazona

- LINEALIDAD DEL METODO

Se procede a realizar el parámetro de linealidad de estándar de rosiglitazona utilizando 5 concentraciones de 60%, 80%, 100%, 120%, 140%, por triplicado, tomando como referencia de 100% del dosaje de rosiglitazona con el que cuenta la tableta en estudio es decir 4mg/tab.

La concentración final de 100% de rosiglitazona es de 24 µg/mL.

Preparación de las soluciones

Solución estándar madre.

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 29
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar.

Solución estándar al 60%

Concentración final: rosiglitazona 14,4ug/mL

Tomar una alícuota de 3 mL de la solución estándar madre y transferirlos a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución estándar al 80%

Concentración final: rosiglitazona 19,2ug/mL

Tomar una alícuota de 4 mL de la solución estándar madre y transferirlos a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución estándar al 100%

Concentración final: rosiglitazona 24 ug/mL

Tomar una alícuota de 5 mL de la solución estándar madre y transferirlos a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución estándar al 120%

Concentración final: rosiglitazona 28,8ug/mL

Tomar una alícuota de 3 mL de la solución estándar madre y transferirlos a un matraz aforado de 25 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	30
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

Solución estándar al 140%

Concentración final: rosiglitazona 33,6ug/mL

Tomar una alícuota de 7 mL de la solución estándar madre y transferirlos a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

- ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Mediante este parámetro se determina la capacidad del método analítico de medir el contenido de rosiglitazona sin interferencias de parte de los excipientes presentes o de posibles productos de degradación del principio activo.

Procedimiento Analítico

Placebo

Pesar exactamente 606 mg de placebo (excipientes), y transferir a un matraz aforado de 500 mL, adicionar 400 mL de ácido clorhídrico 0,1N y colocar en un baño de ultrasonido por 20 minutos, agitar con magneto por 60 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y mezclar con agitación magnética por 30 minutos. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

Solución estándar

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	31
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

Determinación de productos de degradación de rosiglitazona

Se somete al principio activo, a degradación forzada.

TERMOLISIS

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, llevar a baño maría a una temperatura controlada de 60°C por 2 horas, enfriar a temperatura ambiente, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon de 0,45µm de poro.

FOTOLISIS

En un matraz aforado de 100 mL pesar con exactitud 31,8 mg de rosiglitazona maleato estándar de referencia (equivalente a 24 mg de rosiglitazona), adicionar 5 mL de metanol, llevar al ultrasonido por 10 minutos, enrasar con ácido clorhídrico 0,1N y homogeneizar. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz aforado de 50 mL, someter a la acción de la luz UV (254nm) durante 2 horas, llevar a volumen con metanol y homogeneizar. Filtrar por membrana nylon 0,45µm de poro e inyectar.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 32
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

6.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

- LINEALIDAD DEL METODO

Calculo de la recta de regresión :

Ecuación de la recta :

$$y = bx + a$$

Donde:

x : Concentración del analito

y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Formulas para hallar b :

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \sum x \sum y / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

Formulas para hallar a :

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b\sum x}{n}$$

Interpretación estadística de la regresión lineal

Coeficiente de correlación “r”

Esta variable “r” refleja el grado de relación entre las variables **x** (concentración), e **y** (respuesta).

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 33
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Test de Hipótesis para el coeficiente de correlación “r”

H_0 : r es diferente de 1

Criterio de aceptación : r no debe ser significativamente diferente de 1

Formulas para hallar “r”

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2} = \frac{\frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{n}}{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n} \frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n}}$$

Resultado para rosiglitazona : $r = 0,999869132$

Resultado para glimepiride : $r = 0,995122041$

Coeficiente de determinación “ r^2 ”

Es el cuadro del coeficiente de correlación “r”, e indica la proporción de la varianza total de “y”. Este debe ser mayor o igual a 0,99 para ingredientes activos en una formula.

Resultado para rosiglitazona : $r^2 = 0,999738281$

Resultado para glimepiride : $r = 0,990267876$

Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”

H_0 = No hay correlación entre x e y

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	34
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

Criterio de aceptación: si el valor de “t” obtenido es mayor que el “t” de la tabla, calculado para (n – 2) grados de libertad y un nivel de significación del 95% (probabilidad, p=0,05), entonces si hay correlación entre x e y.

Formula para hallar “t” : t_{exp}

$$t_{exp} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Resultados para rosiglitazona

t_{exp} : 107,0499503

$t_{(v:13; \alpha:0,05)}$: 2,16

Resultados para glimepiride

t_{exp} : 17,47161948

$t_{(v:13; \alpha:0,05)}$: 2,16

Test de linealidad

Desviación estándar relativa de los factores de respuesta “f”

Criterio de aceptación : $RSD \leq 5\%$

Formula para hallar “f”

$$f = \frac{y}{x}$$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág.	35
		De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
		Nº	FECHA
		01	SEP/07

LINEALIDAD ROSIGLITAZONA

Estándar de Referencia

Nombre Rosiglitazona maleato
Protocolo 5105944
Pot t/c 96,17%
Vence 05/07

Diluciones

	St1	St2	St3
Dilución madre	<u>31,8</u> 100	<u>31,7</u> 100	<u>32,3</u> 100

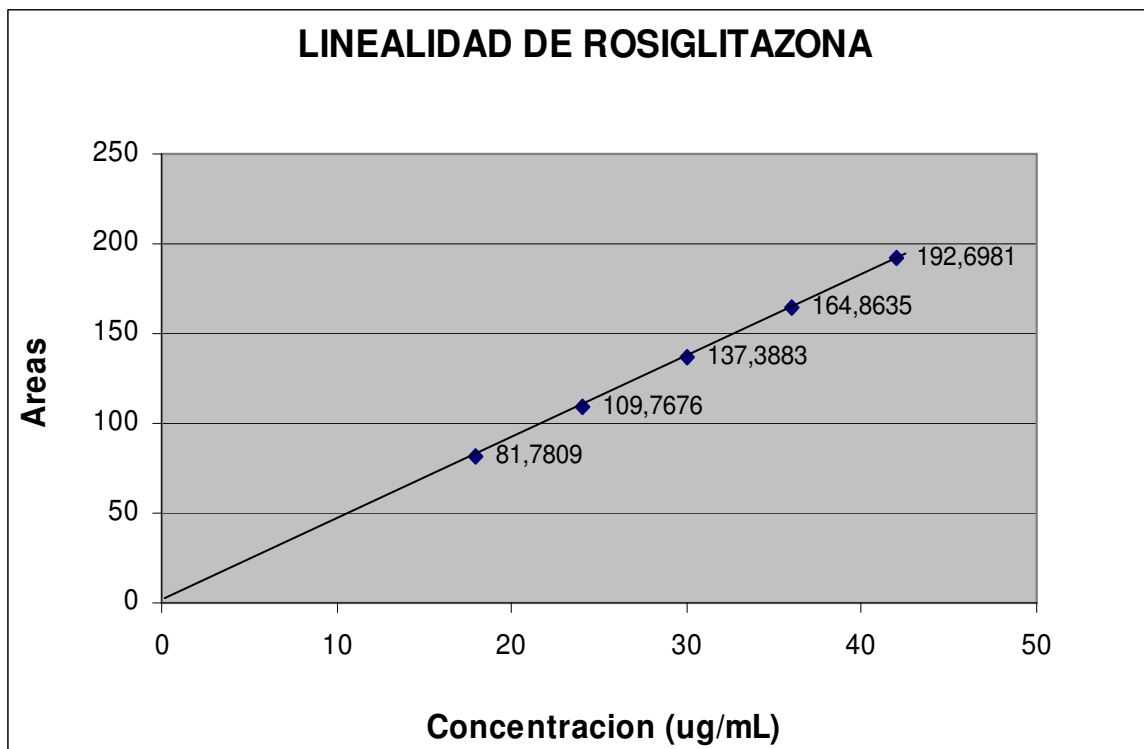
Factor 0,3058206 0,3048589 0,3106291

	Pipeta	Fiola	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Dilución al 60%	3	50	0,018349236	0,018291534	0,018637746
Dilución al 80%	4	50	0,024465648	0,024388712	0,024850328
Dilución al 100%	5	50	0,03058206	0,03048589	0,03106291
Dilución al 120%	3	25	0,036698472	0,036583068	0,037275492
Dilución al 140%	7	50	0,042814884	0,042680246	0,043488074

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 36
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO : VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC		VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Representación grafica de la recta de regresión de rosiglitazona



$$y = 4508,195441X + (-1,48259023)$$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 37
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Concentración teórica	Muestras	mg/mL Inyect (xi)	Áreas (yi)	Promedio (áreas - yi)	S	Si ²	CV
60	St1	0,018349236	82,28188	81,780927	0,705200116	0,49730720	0,862303895
	St2	0,018291534	80,97449				
	St3	0,018637746	82,08641				
80	St1	0,024465648	110,2021	109,767650	2,065059333	4,26447005	1,881133005
	St2	0,024388712	107,51993				
	St3	0,024850328	111,58092				
100	St1	0,03058206	136,77795	137,388323	0,972385649	0,94553385	0,707764405
	St2	0,03048589	136,87735				
	St3	0,03106291	138,50967				
120	St1	0,036698472	164,233	164,863500	1,015653248	1,03155152	0,61605707
	St2	0,036583068	164,32236				
	St3	0,037275492	166,03514				
140	St1	0,042814884	191,82643	192,698177	1,950140604	3,80304837	1,012018192
	St2	0,042680246	191,33597				
	St3	0,043488074	194,93213				
Σ		0,4606543	2059,49573				

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 38
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ANALITO EN LA VARIANZA DE LA RESPUESTA

Concentrac ión teórica	Promedio	n _i	g.l.	Si ²	Si ² x g.l	LnSi ²	g.l. x LnSi ²	1/ g.l.
60	81,780927	3	2	0,49730720	0,994614406	-0,698547329	-1,397094657	0,5
80	109,767650	3	2	4,26447005	8,528940094	1,450317917	2,900635834	0,5
100	137,388323	3	2	0,94553385	1,8910677	-0,05600559	-0,11201118	0,5
120	164,863500	3	2	1,03155152	2,063103039	0,031063999	0,062127997	0,5
140	192,698177	3	2	3,80304837	7,606096749	1,335802949	2,671605898	0,5
Σ		15	10	10,54191099	21,08382199	2,062631946	4,125263891	2,5

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 39
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

**TEST DE BARLETT :
HALLANDO EL CHI CUADRADO (X^2)**

K	C	S ² comb	LnS ² comb	S comb	X ²
5	4,2	2,108382199	0,745920923	1,45026928	0,793796509

CHI CUADRADO (experimental) : 0,794

CHI CUADRADO (teórico) : 9,488 $p = 0,05$ (g.l. = 4)

Conclusión: Como X^2 experimental es menor al X^2 tabulado, se acepta la hipótesis nula. El nivel de variación entre las diferentes concentraciones son iguales entre si estadísticamente, por lo tanto los datos pueden ser tratados en un análisis global.

r = 0,999869132

r² = 0,999738281

Pendiente = 4508,195441

T exp. 107,0499503

Intercepto = -1,48259023

T tab
= 2,16

Ecuación de la recta y = 4508,195441X + (-1,48259023)

CONFORME X
NO CONFORME

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 40
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

LINEALIDAD GLIMEPIRIDE

Estándar de Referencia

Nombre Glimepiride

Protocolo 5112072

Pot t/c 99,81%

Vence 11/07

Diluciones

	St1	St2	St3
Dilución madre	<u>25,4</u>	<u>25,5</u>	<u>26,5</u>
	100	100	100

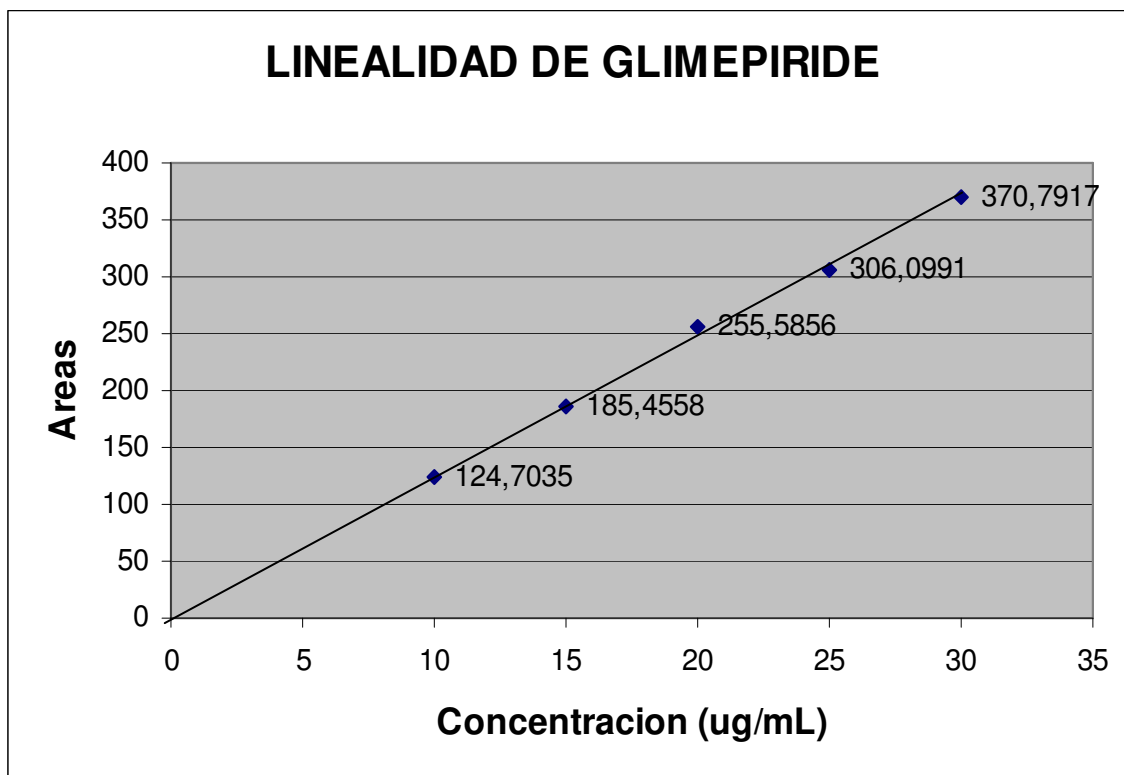
Factor 0,2535174 0,2545155 0,2644965

	Pipeta	Fiola	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Dilución al 50%	2	50	0,010140696	0,01018062	0,01057986
Dilución al 75%	3	50	0,015211044	0,01527093	0,01586979
Dilución al 100%	4	50	0,020281392	0,02036124	0,02115972
Dilución al 125%	5	50	0,02535174	0,02545155	0,02644965
Dilución al 150%	3	25	0,030422088	0,03054186	0,03173958

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 41
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Representación grafica de la recta de regresión para glimepiride



$$y = 11902,72508X + 3,321724976$$

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 42
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Concentración teórica	Muestras	mg/mL Inyect (xi)	Áreas (yi)	Promedio (áreas - yi)	S	Si²	CV
50	St1	0,010140696	124,61325	124,703523	3,546731737	12,57930601	2,844131138
	St2	0,01018062	121,20279				
	St3	0,01057986	128,29453				
75	St1	0,015211044	175,98096	185,455877	8,450961811	71,41875552	4,556858463
	St2	0,01527093	188,1714				
	St3	0,01586979	192,21527				
100	St1	0,020281392	272,99197	255,585633	15,36271777	236,01309729	6,010790814
	St2	0,02036124	243,91975				
	St3	0,02115972	249,84518				
125	St1	0,02535174	294,54355	306,099163	11,79170066	139,04420446	3,852248576
	St2	0,02545155	305,64038				
	St3	0,02644965	318,11356				
150	St1	0,030422088	359,55988	370,791770	14,75509288	217,71276599	3,979347461
	St2	0,03054186	365,31284				
	St3	0,03173958	387,50259				
Σ		0,30901176	3727,9079				

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 43
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ANALITO EN LA VARIANZA DE LA RESPUESTA

Concentración teórica	Promedio	n _i	g.l.	Si ²	Si ² x g.l	LnSi ²	g.l. x LnSi ²	1/ g.l.
50	124,703523	3	2	12,57930601	25,15861203	2,532053084	5,064106168	0,5
75	185,455877	3	2	71,41875552	142,837511	4,268560517	8,537121035	0,5
100	255,585633	3	2	236,01309729	472,0261946	5,4638873	10,9277746	0,5
125	306,099163	3	2	139,04420446	278,0884089	4,9347919	9,869583801	0,5
150	370,791770	3	2	217,71276599	435,425532	5,383176607	10,76635321	0,5
Σ		15	10	676,7681293	1353,536259	22,58246941	45,16493882	2,5

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 44
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

TEST DE BARLETT :
HALLANDO EL CHI CUADRADO (X^2)

K	C	S ² comb	LnS ² comb	S comb	X ²
5	4,2	135,3536259	4,907890804	11,63415772	0,931897435

CHI CUADRADO (experimental) : 0,932

CHI CUADRADO (teórico) : 9,488 $p = 0,05$ (g.l. = 4)

Conclusión: Como X^2 experimental es menor al X^2 tabulado, se acepta la hipótesis nula. El nivel de variación entre las diferentes concentraciones son iguales entre si estadísticamente, por lo tanto los datos pueden ser tratados en un análisis global.

r = 0,995122041

r²= 0,990267876

Pendiente = 11902,72508

T exp. 17,47161948

Intercepto = 3,321724976

T tab = 2,106

Ecuación de la recta y = 11902,72508 X + (3,321724976)

CONFORME X

NO CONFORME

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 45
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Calculo de “f” para rosiglitazona

TABLA Nº1

Dato	µg/mL (x)	Áreas (y)	f
1	18,3	82,28188	4,4963
	18,2	80,97449	4,4491
	18,6	82,08641	4,4132
2	24,4	110,2021	4,5165
	24,3	107,51993	4,4247
	24,8	111,58092	4,4992
3	30,5	136,77795	4,4845
	30,4	136,87735	4,5025
	31,1	138,50967	4,4537
4	36,6	164,233	4,4872
	36,7	164,32236	4,4774
	37,2	166,03514	4,4633
5	42,8	191,82643	4,4819
	42,7	191,33597	4,4809
	43,4	194,93213	4,4915
		Promedio	4,4748
		DS	0,029
		RSD	0,647

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 46
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

Calculo de “f” para glimepiride

TABLA Nº2

Dato	µg/mL (x)	Áreas (y)	f
1	10,1	124,61325	12,3379
	10,1	121,20279	12,0003
	10,5	138,29453	13,1709
2	15,2	175,98096	11,5777
	15,2	188,1714	12,3797
	15,8	192,21527	12,1655
3	20,2	272,99197	13,5145
	20,3	243,91975	12,0158
	21,1	249,84518	11,8410
4	25,3	294,54355	11,6420
	25,4	305,64038	12,0331
	26,4	318,11356	12,0498
5	30,4	359,55988	11,8276
	30,5	365,31284	11,9775
	31,7	387,50259	12,2241
		Promedio	12,1838
		DS	0,525
		RSD	4,309

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 47
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

- PRECISION

Criterios de aceptación

Desviación estándar relativa

En el siguiente cuadro, mostramos el limite permisible de RSD (desviación estándar relativa), para los diferentes métodos de análisis :

Precisión (etapa)	Método analítico	RSD Permisible
1.Repetibilidad	a. Cromatográfico	RSD ≤ 2%
	b. Espectrofométrico	RSD ≤ 2%
	c. Volumétrico	RSD ≤ 2%
2. Precisión intermedia	a. Cromatográfico	RSD ≤ 2%
	b. Espectrofométrico	RSD ≤ 2%
	c. Volumétrico	RSD ≤ 2%

Limites de confianza (aplicable a precisión intermedia)

Resultados Individuales

Media más-menos la desviación estándar ($\bar{x} \pm s$)

Media más-menos dos veces la desviación estándar ($\bar{x} \pm 2s$)

Media más-menos la desviación estándar multiplicada por la “t” de Student ($\bar{x} \pm ts$).

El valor de “t” se halla en las tablas de Student para (n – 1) grados de libertad y una significación el 95%. Se aplica cuando el numero de replicas es inferior a 30.

Resultados Promedio

Los límites de confianza de la media de una serie de resultados son: $\bar{x} \pm ts_x$, siendo s_x la desviación estándar de la media

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 48
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

REPETIBILIDAD ROSIGLITAZONA

Estándar de referencia

Nombre Rosiglitazona maleato

Potencia % 96,17%

Peso (mg) 32,2

N° de Inyección	Áreas	Factor st
1	115,60268	0,278540255
2	117,94849	0,273000528
3	113,64231	0,283345173
4	115,61663	0,278506647
5	115,01663	0,279959515
Promedio	115,56535	0,278670424
RSD %	1,3463	1,34

DILUCIONES

Estándar

$\frac{32,2}{100}$	$\frac{5}{50}$
--------------------	----------------

Factor de St

0,0322

Muestras

$\frac{500}{\text{Pmp}}$	$\frac{1}{1}$
--------------------------	---------------

Factor de mp

500

RESULTADOS

Porcentaje del analito teórico	Peso (mg)	Área	mg de analito hallado	Porcentaje recuperado
Repetibilidad 80%	12,7	89,39199	12,4537	98,061
	12	85,8914	11,9660	99,717
	12,5	89,52093	12,4716	99,773
Repetibilidad 100%	15	105,30173	14,6701	97,801
	15,2	106,44476	14,8294	97,562
	15,3	111,00476	15,4646	101,076
Repetibilidad 120%	19,5	140,47101	19,5697	100,357
	20,6	146,77704	20,4486	99,265
	19,7	143,06581	19,9312	101,174
Promedio RSD				99,42 1,37

CONFORME : X

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 49
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

PRESICION INTERMEDIA ROSIGLITAZONA

Estándar de referencia

Nombre Rosiglitazona Maleato

Potencia % 96,17%

Peso (mg)

st 1º analista 32,7 mg

st 2º analista 32,6 mg

1 º ANALISTA		2º ANALISTA	
Estándar	Áreas	Estándar	Áreas
1	115,42300	1	64,13691
2	114,98729	2	64,67097
3	113,54361	3	64,17603
4	114,99200	4	64,07710
5	116,24252	5	63,99202
Promedio	115,03768	Promedio	64,21061
rsd %	0,85	rsd %	0,42

Diluciones

Estándar de referencia $\frac{32,7}{100}$ $\frac{5}{50}$

Factor St 1º analista 0,03058206

Estándar de referencia $\frac{32,6}{100}$ $\frac{5}{50}$

Factor St 2º analista 0,03038972

Muestras $\frac{500}{Pmp}$ $\frac{1}{1}$

Factor de muestra 500

Peso promedio 206,65

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD			Pág. 50
			De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION			NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC		VERSION
			Nº FECHA
			01 SEP/07

RESULTADOS

Concentración de muestra	Peso de muestra		Áreas		mg/tab	
	1º analista	2º analista	1º analista	2º analista	1º analista	2º analista
Precisión 80%	411,6	415,2	76,35162	43,9499	3,9551	4,0311
Precisión 100%	622,3	618,5	113,24234	63,40513	3,8799	3,9039
Precisión 120%	825,1	827,2	151,09494	86,69386	3,9044	3,9911
Promedio					3,9132	3,9754
RSD %					0,9797	1,6352

Promedio entre dos analistas	3,97
RSD % entre dos analistas	1,49

CONFORME **X**

NO CONFORME

1º analista Luis Acosta Castillo 2º analista Felipe Ramirez Huayhuas

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 51
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

REPETIBILIDAD GLIMEPIRIDE

Estándar de referencia

Nombre Glimepiride
Potencia % 99,81%
Peso (mg) 25,5

N° de Inyección	Áreas	Factor st
1	243,59824	0,104680559
2	243,74371	0,104618084
3	244,11336	0,104459666
4	241,71941	0,105494217
5	241,88100	0,105423741
Promedio	243,01114	0,104935254
RSD %	0,4620	0,46

DILUCIONES

Estándar

<u>25,5</u>	<u>4</u>
100	50

Factor St

0,0204

Muestras

<u>25</u>	<u>100</u>
Pmp	2

Factor mp

1250

RESULTADOS

Porcentaje del analito teórico	Peso (mg)	Área	mg de analito hallado	Porcentaje recuperado
Repetibilidad 80%	20,5	194,68527	20,4290	99,654
	21,1	197,94421	20,7710	98,441
	20,8	197,98302	20,7750	99,880
Repetibilidad 100%	25,7	244,66614	25,6737	99,898
	26,5	251,32941	26,3729	99,520
	25,6	241,11717	25,3013	98,833
Repetibilidad 120%	30,9	294,34918	30,8871	99,958
	30,2	290,50714	30,4839	100,940
	30,7	289,13522	30,3400	98,827
Promedio				99,55
RSD				0,76

CONFORME : X

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 52
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

PRESICION INTERMEDIA GLIMEPIRIDE

Estándar de referencia

Nombre	Glimepiride
Potencia %	99,81%
Peso (mg)	
st 1º analista	25,8
st 2º analista	25,7

1 º ANALISTA		2º ANALISTA	
Estándar	Áreas	Estándar	Áreas
1	240,34944	1	335,20224
2	237,14813	2	334,64883
3	241,46039	3	331,94934
4	242,27760	4	335,73563
5	241,51820	5	336,05927
Promedio	240,55075	Promedio	334,71906
rsd %	0,84	rsd %	0,49

Diluciones

Estándar de referencia	$\frac{25,8}{100}$	$\frac{4}{50}$	
Factor St 1º analista			0,020600784
Estándar de referencia	$\frac{25,7}{100}$	$\frac{4}{50}$	
Factor St 2º analista			0,020520936
Muestras	$\frac{100}{\text{Pmp}}$	$\frac{1}{1}$	
Factor de muestra	100		
Peso Promedio	206,65		

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD				Pág.	53
				De Pág.	64
PROTOCOLO DE VALIDACION				NUMERO	
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC			VERSION	
				Nº	FECHA
				01	SEP/07

RESULTADOS:

Concentración de muestra	Peso de muestra		Áreas		mg/tab	
	1 ºanalista	2ºanalista	1º analista	2º analista	1 ºanalista	2º analista
Precisión 80%	160,4	154	186,63203	249,36981	2,0592	2,0515
Precisión100%	205,7	222,7	232,72293	366,16635	2,0022	2,0831
Precisión120%	250,1	250,7	282,21011	399,87375	1,9970	2,0208
Promedio					2,0195	2,0518
RSD %					1,7081	1,5186

Promedio entre dos analistas	2,04
RSD % entre dos analistas	1,69

CONFORME X

NO CONFORME

1º analista Luis Acosta Castillo 2º analista Felipe Ramirez Huayhuas

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 54
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

- EXACTITUD

Aplicación del Test “t” de las tablas, para (n-1) grados e libertad y un nivel de significación del 95% (p=0,05), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito.

Formula para hallar el valor de “t” experimental : t_{exp}

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD}$$

Donde :

R : Porcentaje de Recuperación Promedio de todos los datos

n : Numero de datos o mediciones

RSD : Desviación Estándar Relativa o Coeficiente de Variación del total de mediciones

Resultados :

Rosiglitazona

t_{exp} : 1,268633987

$t_{(v:13; \alpha:0,05)}$: 2,306

Glimepiride

t_{exp} : 1,770587543

$t_{(v:13; \alpha:0,05)}$: 2,306

Como t_{exp} es menor a t_{tablas} , entonces no existe diferencia significativa entre la cantidad media de analito añadido y el porcentaje recuperado.

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 55
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

EXACTITUD DEL METODO ROSIGLITAZONA

Estándar de referencia

Nombre Rosiglitazona maleato
Peso 32,2 mg
Potencia t/c 96,17%

N° de Inyección	Áreas	Factor
1	115,60268	0,278540255
2	117,94849	0,273000528
3	113,64231	0,283345173
4	115,61663	0,278506647
5	115,01663	0,279959515
Promedio	115,56535	0,278670424
RSD %	1,35	1,35

DILUCIONES

Estándar de referencia

<u>32.2</u>	<u>5</u>
100	50

Factor St : 0,0322

Muestras

<u>500</u>	<u>1</u>
Peso (mg)	1

Factor mp : 500

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 56
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

RESULTADOS:

Porcentaje teórico	Cantidad agregada (mg)	Áreas	Cantidad encontrada (mg)	Porcentaje
Exactitud 80%	12,7	89,39199	12,4537	98,0603
	12	85,8914	11,9660	99,7164
	12,5	89,52093	12,4716	99,7730
Exactitud 100%	15	105,30173	14,6701	97,8008
	15,2	106,44476	14,8294	97,5616
	15,3	111,00476	15,4646	101,0761
Exactitud 120%	19,5	140,47101	19,5697	100,3576
	20,6	146,77704	20,4483	99,2634
	19,7	143,06581	19,9312	101,1738
Promedio				99,42
RSD %				1,37

T exp 1,268633987

T tabla 2,306

CONFORME X

NO CONFORME

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 57
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

EXACTITUD DEL METODO GLIMEPIRIDE

Estándar de referencia

Nombre Glimepiride
Peso 25,5 mg
Potencia t/c 99,81%

N° de Inyección	Áreas	Factor
1	243,59824	0,104680559
2	243,74371	0,104618084
3	244,11336	0,104459666
4	241,71941	0,105494217
5	241,88100	0,105423741
Promedio	243,01114	0,104935254
RSD %	0,46	0,46

DILUCIONES

Estándar de referencia

<u>25,5</u>	<u>4</u>
100	50

Factor St : 0,0204

Muestras

<u>25</u>	<u>100</u>
Peso (mg)	2

Factor mp : 1250

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 58
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

RESULTADOS:

Porcentaje teórico	Cantidad agregada (mg)	Áreas	Cantidad agregada (mg)	Porcentaje recuperado
Exactitud 80%	20,5	194,68527	20,4290	99,6537
	21,1	197,94421	20,7710	98,4406
	20,8	197,98302	20,7750	99,8800
Exactitud 100%	25,7	244,66614	25,6737	99,8975
	26,5	251,32941	26,3729	99,5202
	25,6	241,11717	25,3013	98,8330
Exactitud 120%	30,9	294,34918	30,8871	99,9582
	30,2	290,50714	30,4839	100,9401
	30,7	289,13522	30,3400	98,8272
Promedio				99,55
RSD %				0,76

T exp 1,770587543
T tabla 2,306

CONFORME X

NO CONFORME

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 59
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

- SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD

a) Determinación del tiempo de retención de los picos de glimepiride y rosiglitazona :

Glimepiride en la solución estándar de referencia :

Tiempo de retención : 4,84 min

Glimepiride en la solución muestra :

Tiempo de retención : 4,82 min

Rosiglitazona en la solución estándar de referencia :

Tiempo de retención : 3,09 min

Rosiglitazona en la solución muestra :

Tiempo de retención : 3,11 min

b) Determinación de picos cromatográficos de excipientes en el placebo :

No se detectan picos cromatográficos de excipientes en el placebo

c) Determinación de productos de degradación de glimepiride y rosiglitazona :

No se detectan picos cromatográficos de los posibles productos de degradación de ambos analitos, por efecto de los diferentes métodos de degradación forzada a la que han sido sometidos

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 60
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

SELECTIVIDAD ROSIGLITAZONA

Sustancia tratada		Evaluado en el método	Interferencia < 2%	Reactivo usado en el tratamiento	Condiciones	Observaciones
Placebo	Excipientes	Sí	< 2%	*	**	OK
Fase móvil	NA	----	----	----	----	----
Termólisis	Estándar	Sí	< 2%	*	60°C X 2 hora	OK
Fotólisis	Estándar	Sí	< 2%	*	60°C X 2 hora	OK
* Reactivos empleados en la técnica de análisis en evaluación. ** Las que se señalan en la técnica CONFORME X NO CONFORME						

SELECTIVIDAD GLIMEPIRIDE

Sustancia tratada		Evaluado en el método	Interferencia < 2%	Reactivo usado en el tratamiento	Condiciones	Observaciones
Placebo	Excipientes	Sí	< 2%	*	**	OK
Fase móvil	NA	----	----	----	----	----
Termólisis	Estándar	Sí	< 2%	*	60°C X 2 hora	OK
Fotólisis	Estándar	Sí	< 2%	*	60°C X 2 hora	OK
* Reactivos empleados en la técnica de análisis en evaluación. ** Las que se señalan en la técnica CONFORME X NO CONFORME						

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 61
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

RANGO DE ROSIGLITAZONA

parámetros evaluados	Exactitud	Precisión	Linealidad
Rango	80% - 120%	80% - 120%	60% - 140%
Resultado	Conforme	Conforme	Conforme
Resultado:	Rango: 60% - 140%		

CONFORME X
NO CONFORME

RANGO DE GLIMEPIRIDE

Parámetros evaluados	Exactitud	Precisión	Linealidad
Rango	80% - 120%	80% - 120%	50% - 150%
Resultados	Conforme	Conforme	Conforme
Resultado:	Rango: 50% - 150%		

CONFORME X
NO CONFORME

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 62
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

PRECISIÓN DEL SISTEMA ROSIGLITAZONA

Estándar de referencia

Nombre Rosiglitazona maleato Pst : 32,9 mg
Lote 5105944
Fecha de expira 05/07
Pot t/c 96,17%

Resultados :

Nº de inyección	Áreas	Tiempos
1	138,28349	3,113
2	138,37750	3,094
3	139,35753	3,113
4	138,34555	3,098
5	138,08195	3,057
6	138,21768	3,073
PROMEDIO	138,44395	3,09133
RSD %	0,33	0,72

PRECISIÓN DEL SISTEMA DE GLIMEPIRIDE

Estándar de referencia

Nombre Glimepiride Pst : 25,7 mg
Lote 5112072
Fecha de expira 11/07
Pot t/c 99,81%

Resultados :

Nº de inyección	Áreas	Tiempos
1	247,92664	4,838
2	248,23183	4,839
3	248,27203	4,836
4	246,31807	4,833
5	250,61534	4,839
6	251,32069	4,838
PROMEDIO	248,78077	4,83717
RSD %	0,74	0,05

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 63
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO :	VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION
		Nº FECHA
		01 SEP/07

7. INFORME TECNICO

7.1 RESUMEN DE RESULTADOS: GLIMEPIRIDE

PARAMETRO	LIMITE	RESULTADOS
Precisión del sistema	$RSD \leq 2 \%$	0,745%
Especificidad		
• Placebo	Respuesta $< 2 \%$	Conforme
• Interferencia con la respuesta del principio activo de interés en el rango de la medida	Negativo	Conforme
Exactitud		
• Porcentaje de recuperación	Aceptación según test de hipótesis	99,550
• Test de hipótesis	$T_{exp} < T_{tabla}$	$T_{exp} = 1,771$ $T_{tabla} = 2,306$
Precisión del método		
• <i>Repetibilidad</i>		
Método cromatográfico	$RSD \leq 2 \%$	0,762
Método espectrofotométrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Método volumétrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
• <i>Precisión Intermedia</i>		
Método cromatográfico	$RSD \leq 2 \%$	1,805
Método espectrofotométrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Método volumétrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Linealidad del método		
• Ecuación de la recta	$y = mx + b$	$y = 11902,72508X + (3,322)$
• Coeficiente de correlación	$r \geq 0,99$	$r = 0,995$
• Test de hipótesis para demostrar regresión en función de "r"	$T_{exp} > T_{tabla}$	$T_{exp} = 17,472$ $T_{tabla} = 2,106$
Rango	80 % - 120 %	80% - 120%

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

SISTEMA DE CALIDAD		Pág. 64
		De Pág. 64
PROTOCOLO DE VALIDACION		NUMERO
TITULO : VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE VALORACION DE ROSIGLITAZONA 4mg/ GLIMEPIRIDE 2mg TABLETAS RECUBIERTAS POR HPLC	VERSION	
	Nº	FECHA
	01	SEP/07

7.2 RESUMEN DE RESULTADOS: ROSIGLITAZONA

PARAMETRO	LIMITE	RESULTADOS
Precisión del sistema	$RSD \leq 2 \%$	0,332%
Especificidad		
• Placebo	Respuesta $< 2 \%$	Conforme
• Interferencia con la respuesta del principio activo de interés en el rango de la medida	Negativo	Conforme
Exactitud		
• Porcentaje de recuperación	Aceptación según test de hipótesis	99,420
• Test de hipótesis	$T_{exp} < T_{tabla}$	$T_{exp} = 1,269$ $T_{tabla} = 2,306$
Precisión del método		
• <i>Repetibilidad</i>		
Método cromatográfico	$RSD \leq 2 \%$	1,371
Método espectrofotométrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Método volumétrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
• <i>Precisión Intermedia</i>		
Método cromatográfico	$RSD \leq 2 \%$	1,705
Método espectrofotométrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Método volumétrico	$RSD \leq 2 \%$	-----
Linealidad del método		
• Ecuación de la recta	$y = mx + b$	$y = 4508,195441X + (-1,1483)$
• Coeficiente de correlación	$r \geq 0,99$	$r = 0,9999$
• Test de hipótesis para demostrar regresión en función de "r"	$T_{exp} > T_{tabla}$	$T_{exp} = 107,05$ $T_{tabla} = 2,106$
Rango	80 % - 120 %	80% - 120%

ELABORADO POR :	APROBADO POR :	AUTORIZADO POR :
-----------------	----------------	------------------

IV. DISCUSION DE RESULTADOS

- Linealidad de rosiglitazona

La linealidad del método de valoración de rosiglitazona en la tableta para el rango del 50% al 150%, queda demostrada al obtener un coeficiente de correlación $r = 0,99986$ a partir de la ecuación de la recta (concentración vs. áreas)

$$y = 4508,195441X + (-1,1483)$$

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,999738; siendo el valor mínimo permisible de 0,99 por lo tanto existe una correlación lineal, es decir una relación lineal entre la concentración del analito y el área obtenida.

Queda establecido que la pendiente de la recta de regresión (4508,195441), es significativamente diferente de cero mediante la aplicación del test de hipótesis para la pendiente donde el $t_{\text{exp}}(107,05)$ es mayor al $t_{\text{tabla}}(2,160)$ para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%.

Otro dato a considerar es el coeficiente de variación de los factores de respuesta f que debe ser menor al 5%, obteniéndose : 0,647; por lo tanto hay una sensibilidad de calibrado a las concentraciones analizadas.

Precisión de rosiglitazona

Los valores de RSD obtenidos (1,37% para repetibilidad y 1,39% para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico.

Exactitud de rosiglitazona

Al aplicar el test de student para demostrar la exactitud del método analítico, se obtuvo un t_{exp} , (1,2686); menor al t de las tablas, (2,306); por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y al cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%.

Linealidad de glimepiride

La linealidad del método de valoración de glimepiride en la tableta para el rango del 50% al 150%, queda demostrada al obtener un coeficiente de correlación $r = 0,995122$ a partir de la ecuación de la recta (concentración vs. áreas)

$$y = 11902,72508X + (3,321724)$$

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9902678; siendo el valor mínimo permisible de 0,99 por lo tanto existe una correlación lineal, es decir una relación lineal entre la concentración del analito y el área obtenida.

Queda establecido que la pendiente de la recta de regresión (11902,72508), es significativamente diferente de cero mediante la aplicación del test de hipótesis para la pendiente donde el $t_{exp}(17,47161948)$ es mayor al $t_{tabla}(2,106)$ para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%.

Otro dato a considerar es el coeficiente de variación de los factores de respuesta f que debe ser menor al 5%, obteniéndose : 4,309; por lo tanto hay una sensibilidad de calibrado a las concentraciones analizadas.

Precisión de glimepiride

Los valores de RSD obtenidos (0,76%, para repetibilidad y 1,69%, para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico.

Exactitud de glimepiride

Al aplicar el test de student para demostrar la exactitud del método analítico, se obtuvo un t_{exp} , (1,7705); menor al t de las tablas, (2,306); por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y al cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%.

- Selectividad y Especificidad

Los métodos analíticos para glimepiride y rosiglitazona nos permiten obtener picos cromatográficos con tiempos de retención similares, tanto para el estándar como para la muestra. El análisis cromatográfico del placebo de las tabletas nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, como tampoco se ha detectado presencia de productos de degradación de Glimepiride y Rosiglitazona al realizar los análisis de los principios activos sometidos a diferentes procedimientos de degradación forzada.

Por lo tanto los métodos analíticos propuestos son selectivos y específicos para el fin propuesto.

V. CONCLUSIONES

Los métodos desarrollados y validados de valoración por HPLC de glimepiride y rosiglitazona, producen resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro del intervalo de 50% a 150% para glimepiride y 60% a 140% para rosiglitazona, de esta manera se concluye que ambos métodos son óptimos para el análisis cuantitativo de ambos principios activos.

El método es preciso porque nos permiten obtener resultados repetitivos y reproducibles, cuando este es aplicado en análisis repetitivos de la misma muestra.

El método es exacto, ya que permite la recuperación de la totalidad de analito presente en la muestra; lo cual se demuestra con la cuantificación de analito añadido a determinada cantidad del placebo de la tableta

El método es sensible, ya que es capaz de detectar y cuantificar concentraciones mínimas de analito en la muestra.

El método es selectivo y específico porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes presentes en la tableta.

El método analítico validado es rápido y sencillo; y el costo de realización del mismo no es elevado, con lo que se reconoce que la validación es una herramienta de mejoramiento continuo en la industria farmacéutica.

VI. RECOMENDACIONES

Los laboratorios farmacéuticos con sus respectivas áreas de aseguramiento de la calidad, deberán contemplar la estructuración de un grupo multidisciplinario que asuma la dirección del programa de validación, fijando las normas operativas básicas que sirvan de guía para la ejecución y evaluación del mismo.

Con respecto a la validación de los métodos analíticos y su adecuada documentación, se recomienda el uso de un formato único, el cual contemple de forma detallada el desarrollo de la validación, como lo establecen las normas de buenas practicas de laboratorio, desde el establecimiento de objetivos, hasta la elaboración del informe técnico, el mismo que presente en forma concisa los resultados.

Los laboratorios farmacéuticos deberán contar con personal calificado y los recursos necesarios (columnas adecuadas, reactivos, material de vidrio, equipos, etc) para realizar la validación de métodos analíticos, con lo cual se garantiza la fiabilidad de los resultados.

Se debe considerar la validación de los métodos analíticos a ser aplicados en las labores de análisis; así estos estén contemplados en las farmacopeas oficiales; ya que las condiciones analíticas no son las mismas que aquellas con las que fueron concebidos, además de ser una disposición de autoridad sanitaria DIGEMID, quien controla el cumplimiento de este punto, mediante las auditorias periódicas que realiza

Recomendamos la aplicación del método analítico de valoración de glimepiride y rosiglitazona en tabletas utilizando la técnica de HPLC, por ser este rápido, sencillo y de bajo costo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The United States Pharmacopeia 29th. Capítulos de Validación de Métodos Analíticos 1227 y Cromatografía <621>. The United States Pharmacopeia. Rockville 20852-2006
2. British Pharmacopeia. Monograph development: Methods of Analysis (supplementary chapter IID A447, A448). Vol 2. 2002 London
3. Aguirre L, García J y otros, Validación de Métodos Analíticos A.E.F.I. Barcelona-2002
4. Berry. I R, Nash R. A., Proceso de Validación y Seguridad de la calidad, Pharmaceutical Process Validation. New York 1993
5. Ministerio de Salud-Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos Farmacéuticos. Lima 1999.
6. Benitez Polomeque. Good Manufacturing Practice. Editorial Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica. Madrid 1996.
7. Food and Drug Administration (1996) Validation of Analytical Procedure: Methodology Guidance for Industry. ICH [sitio en internet] disponible en www.fda.gov/cder/guidance/index.htm, acceso el 19 de junio 2007
8. Food and Drug Administration (1996) Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance. CMC [sitio en internet] disponible en: www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpnotest.htm. acceso el 19 de junio 2007
9. Ludwig Huber. Good Laboratory Practice and Current. Good Manufacturing Practice. Berlin 2000.

10. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas N°27 57-62
Septiembre Bogotá 1998.
11. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center for
Drugs Evaluation and Research (CDER). Noviembre 1994-Pittsburg
12. William Gibson, Keith Powell-Evans. Validation Fundamentals Interpharm
Pre. Inc New York
13. Quatrocchi O, Abelaira de Andrizzi S, Laba R. Introducción al HPLC.
Aplicación y Práctica. Validación de Métodos Capítulo 12. Buenos Aires-
1992.
14. The Merck Index 13 Edition, USA. Publisher by Merck & Co. INC
Whitehouse Station New York 1996.
15. Validación de valoración de Glimipiride presentación comprimido 4mg por
HPLC. Silva Cajas y Guido Vidal. Lima 2004
16. Chromatographic. Friedrich Vieweg & Sohn-Verlag GmbH Issue: Volume
59, Numbers 7-8 April 2004 451 – 453. Wiesbaden
17. Journal Chromatographic 1990 Apr 6;526(2):497-505. Philadelphia
18. Garcia M. Optimizacion, Validacion y Modelizacion de un proceso de
fabricacion de comprimidos. Tesis doctoral Universidad de Barcelona.
Barcelona-2001

19. Enders J. Garantia y Control de Calidad. En Gennaro AR. Editor. Remington Farmacia. 20 ed. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana. 2003.p. 1137-1143
20. Gonzales C. Validacion retrospectiva y control estadistico de procesos en la industria farmaceutica. Tesis Universidad de Chile. Santiago-2005
21. Swartz M. E. Krull I. S. Validation of Cromathographic Methods; Pharmaceutical Technology; March 1998
22. C. Fauli I. Trillo; Tratado de Farmacia Galenica; "Validacion de Procesos y Analitica de Medicamentos"; Madrid 1996